

# MutaPLEX® CoV-2 MUT

## Real-Time-RT-PCR-Kit

*Für die simultane Differenzierung des neuen Coronavirus (SARS-CoV-2), lineages B.1.1.7 (UK), B.1.351 (ZA) and P.1 (BRA)*  
*For the simultaneous differentiation of the novel coronavirus (SARS-CoV-2), lineages B.1.1.7 (UK), B.1.351 (ZA) and P.1 (BRA)*

Gültig ab / Valid from 2021-03-08



→REF KG193196



96



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Inhalt

<b>1</b>	<b>VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>TESTPRINZIP</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>4</b>	<b>ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>2</b>
<b>5</b>	<b>TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT</b>	<b>3</b>
<b>6</b>	<b>WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>3</b>
<b>7</b>	<b>PROBENMATERIAL</b>	<b>4</b>
<b>8</b>	<b>PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<b>9</b>	<b>REAL-TIME-RT-PCR</b>	<b>5</b>
	9.1 <i>Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	5
	9.2 <i>Durchführung</i>	5
	9.3 <i>Geräteeinstellungen</i>	6
	9.4 <i>Thresholds</i>	7
<b>10</b>	<b>ANALYSE DER ERGEBNISSE</b>	<b>7</b>
	10.1 <i>Interpretation der PCR-Signale</i>	7
	10.2 <i>Interpretation der Ergebnisse</i>	10
<b>11</b>	<b>VALIDIERUNGSDATEN</b>	<b>12</b>
<b>12</b>	<b>EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>12</b>
<b>13</b>	<b>PROBLEMBEHANDLUNG</b>	<b>13</b>
<b>14</b>	<b>LEISTUNGSDATEN</b>	<b>14</b>
<b>5</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b>	<b>14</b>
<b>16</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>14</b>

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR-Kit ist ein Screening-Test für den simultanen Nachweis und die Differenzierung der RNA des neuartigen Coronavirus (SARS-CoV-2) und dessen Mutationen B.1.1.7 (Großbritannien, UK), B.1.351 (Südafrika, ZA) und P.1 (Brasilia, BRA) extrahiert aus biologischen Proben.

## 2 TESTPRINZIP

Der MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR-Kit enthält vier spezifische Primer- und Sondensysteme zum Nachweis von SARS-CoV-2-Spikeproteinmutationen. Jede Mutation ist einem bestimmten Farbstoff zugeordnet. Wenn die Probe für eine der Mutationen positiv ist, dann zeigt der jeweilig spezifische Kanal kein oder ein verzögertes Signal an. Die mit diesem Test abgedeckten Mutationen sind del69/70 (FAM), del 241-243 (ROX), N501Y (HEX) und H655Y (Cy5). Im Falle von B.1.1.7 (UK), B.1.351 (ZA) oder P.1 (BRA) zeigen der HEX-Kanal und ein zusätzlicher Kanal, je nach Mutation, kein oder ein verzögertes Signal (Tabelle 7). In diesem Fall müssen die beiden anderen Kanäle ein normales Signal anzeigen.

## 3 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 Reaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR-Kits.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt
Reaktionsmix	gelb	1 x 1 325 µl
Enzym	blau	1 x 19.2 µl
Positive Kontrolle	rot	1 x 150 µl
Verdünnungspuffer	weiß	2 x 960 µl

## 4 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Sterile Reaktionsgefäße
- Kalibrierte Pipetten (variable Volumina) und sterile Einweg-Spitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortex-Wirbelmischer
- Real-Time-PCR-Gerät
- optische PCR-Gefäße mit Deckel oder Platten mit Folie
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

## 5 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR-Kits erfolgt gefroren auf Trockeneis oder Kühlakkus. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei mindestens -20°C zu lagern. Bis zu 20 Frier-Auftau-Zykeln sind möglich. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Nach Anbruch der Reagenzien sind diese für maximal sechs Monate bei +2 bis +8°C haltbar.

Schützen Sie den Test während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

## 6 WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt verwenden.

- Alle Proben müssen als potentiell infektiös und/oder biogefährdend betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.
- Die Real-Time-RT-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Bei Verwendung der Kitkomponenten sind stets puderfreie Einmal-schutzhandschuhe zu tragen.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Kontaminationen der Eluate und Kitkomponenten mit Mikroben oder Nukleasen (RNAsen und DNAsen) sind zu vermeiden.
- Positives und potentiell positives Material muss stets von allen anderen Kitkomponenten separiert bleiben.

- Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht öffnen, um Verunreinigungen zu vermeiden.
- Gemäß Richtlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher oder bundesstaatlicher Vorschriften oder bevollmächtigter Organisationen können zusätzliche Kontrollen getestet werden.
- Reaktionsgefäße nach der PCR nicht autoklavieren, da dies die amplifizierten Nukleinsäure nicht degradieren wird und das Risiko beinhaltet, den Laborbereich zu kontaminieren.
- Entsorgen Sie die Proben und Testabfälle gemäß Ihrer örtlichen Sicherheitsvorschriften.

## 7 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für den MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR-Kit ist RNA, die positiv durch eine SARS-CoV-2 Real-Time-RT-PCR (z.B. MutaPLEX Coronavirus Real-Time-RT-PCR Kit, Immundiagnostik, Kat.-Nr. KG192696) getestet wurde. **Eluate mit sehr niedrigen Kopienzahlen, die zu  $C_T$ -Werten  $> 32$  führen, eignen sich nicht zur Testung mit dem MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR-Kit.**

## 8 PROBENVORBEREITUNG

Die eluierte RNA muss 1:10 im Verdünnungspuffer verdünnt werden, um den Zustand für den Mutationsnachweis zu optimieren. Verwenden Sie keine anderen Puffer als den im MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR-Kit enthaltenen Verdünnungspuffer.

Tabelle 2: Probenvorbereitung

Volumen pro Reaktion
2 µl eluierte RNA
18 µl Verdünnungspuffer

## 9 REAL-TIME-RT-PCR

### 9.1 Wichtige Hinweise vor Beginn

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“).
- Bevor Sie die RT-PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-Time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die RT-PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem RT-PCR-Lauf mindestens eine Positivkontrolle sowie eine „No Template“-Kontrolle (Verdünnungspuffer) enthalten sein sollte.
- Vor jedem Gebrauch müssen alle Reagenzien aufgetaut, gründlich gemischt (außer dem Enzym - blauer Deckel) und kurz anzentrifugiert werden.
- Wegen der hohen Viskosität des Enzyms (blauer Deckel) wird ein 15 minütiges Vorwärmen bei Raumtemperatur empfohlen.
- Wir empfehlen, die Reagenzien stets in einem Kühlblock (+2 bis +8 °C) oder auf Eis zu kühlen.

### 9.2 Durchführung

Bereiten Sie den Master Mix gemäß Tabelle 3 vor.

Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten RT-PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr an als benötigt (N+1).

Tabelle 3: Herstellung des Master-Mixes

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
13,8 µl Reaktionsmix	13,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzym	0,2 µl x (N+1)

### Real-Time-RT-PCR

- Pipettieren Sie **14 µl** des Master Mix in jedes optische PCR-Reaktionsgefäß bzw. in die optische PCR-Reaktionsplatte.
- **6 µl** der RNA-Euate, der Positiv-Kontrolle und der „No Template“-Kontrolle in die entsprechenden Gefäße bzw. Vertiefungen der Platte pipettieren (Tabelle 4).
- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 4: Ansetzen der Real-Time-RT-PCR

Komponente	Volumen
Master-Mix	14,0 µl
Probe	6,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

### 9.3 Geräteeinstellungen

Nutzen Sie für die Real-Time-RT-PCR das in Tabelle 5 beschriebene Temperaturprofil.

Tabelle 5: Real-Time-RT-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Reverse Transkription	10 min	45 °C	1
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1
Denaturierung	10 s	95 °C	45
Annealing und Ver- längerung	40 s	60 °C	
	Messung am Ende dieses Schrittes		

Abhängig vom verwendeten Real-Time-Gerät müssen noch weitere, in Tabelle 6 aufgelistete Einstellungen vorgenommen werden.

Tabelle 6: Überblick über die für die MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR benötigten Geräteeinstellungen

Real-Time-PCR-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen		
LightCycler 480II			Colour Compensation Kit MutaPlex® CC-1 (KG19-5-CC) wird benötigt		
			Melt factor	Quant factor	Max integrati- on time (s)
	del69/70 (UK)	465–510	1	10	1
	N501Y (UK, ZA, BRA)	533–580	1	10	2
	del241-243 (ZA)	533–610	1	10	2
H655Y (BRA)	618–660	1	10	3	

Real-Time-PCR-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen
Mic qPCR Cycler	del69/70 (UK) N501Y (UK, ZA, BRA) del241-243 (ZA) H655Y (BRA)	grün gelb orange rot	Gain 8 Gain 10 Gain 10 Gain 10
Bio-Rad CFX96 QuantStudio 5	del69/70 (UK) N501Y (UK, ZA, BRA) del241-243 (ZA) H655Y (BRA)	FAM HEX ROX Cy5	Option Reference Dye: NO
NEOS-48 qPCR NEOS-96 qPCR	del69/70 (UK) N501Y (UK, ZA, BRA) del241-243 (ZA) H655Y (BRA)	FAM HEX ROX Cy5	Option Reference Dye: NO

## 9.4 Thresholds

Um die Qualität der PCR zu gewährleisten, wird empfohlen, die Schwellenwerte (außer LightCycler 480II) auf der Grundlage der mit dem Kit gelieferten Positivkontrolle festzulegen. Die  $C_T$ -Werte für den FAM-, ROX- und Cy5-Kanal sollten bei 19 – 22 liegen. Der  $C_T$  für HEX sollte 22 – 25, ca. 3 – 4  $C_T$  nach dem FAM-Signal sein.

# 10 ANALYSE DER ERGEBNISSE

## 10.1 Interpretation der PCR-Signale

**Positive Signal:** Für jede Probe sind bis zu 4 Kurven vorhanden. Bei Wildtyp-Proben (Wuhan ähnlich SARS-CoV-2) sollten sich die  $C_T$ -Werte für alle Farbstoffe dieser Kurven innerhalb eines Bereichs von 6  $C_T$  gruppieren. Alle Signale im Bereich von +6  $C_T$  nach dem frühesten Signal sollten als positives Signal betrachtet werden (siehe Beispiele in Abb. 1 - 6).

**Negatives Signal:** Im Falle einer vorliegenden Mutation zeigen verschiedene Fluoreszenzkanäle keine Amplifikation. Bei höher konzentrierten Proben kann ein verringertes Signal im FAM-, HEX-, ROX- oder Cy5-Kanal auftreten. In diesem Fall müssen die  $C_T$ -Werte in Relation zum frühesten  $C_T$  ausgerichtet werden. Wenn das verringerte Signal eine Differenz von 6  $C_T$  oder mehr zeigt, sollte das Signal als negatives Signal berücksichtigt werden.

**Höchstgrenze:** Es gibt keine explizite Höchstgrenze für die PCR, aber wenn es Ergebnisse mit einer einzigen Kurve für nur einen Farbstoff gibt, die einen  $C_T$  von > 40



zeigt, wird empfohlen, die PCR mit einer neuen Verdünnung zu wiederholen, wie im Abschnitt „Trouble Shooting“ für sehr schwache Proben vorgeschlagen.

Die **Abbildungen 1, 2, 3, 4, 5** und **6** zeigen Beispiele für Real-Time-RT-PCR-Ergebnisse des Wildtyps und verschiedener SARS-CoV-2 Mutationen.

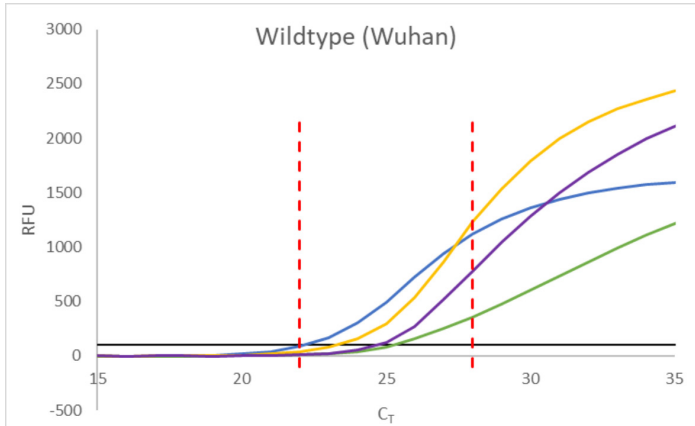


Abb. 1: Nachweis von SARS-CoV-2 RNA des Wildtyp-Virus (Wuhan). Alle vier Kanäle (blau: FAM, grün: HEX; orange: ROX, lila: Cy5) zeigen ein positives Signal und die  $C_T$ -Werte liegen nahe beieinander (weniger als 6  $C_T$  zwischen dem ersten und dem letzten Signal, rote Linien).

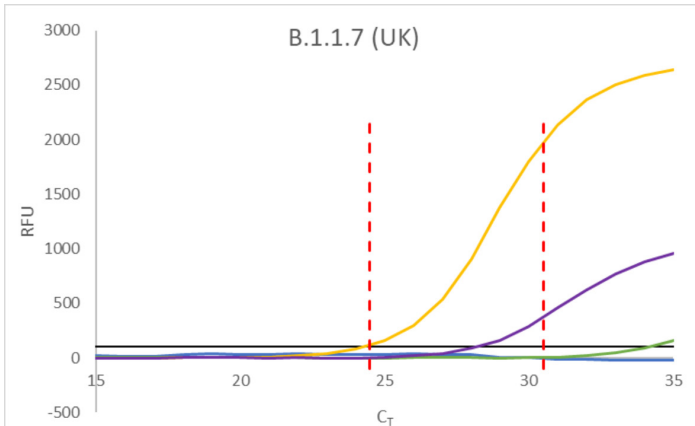


Abb. 2: Nachweis der Mutation B.1.1.7 (UK) SARS-CoV-2 RNA. Nur die Signale von zwei Kanälen (orange: ROX, lila: Cy5) zählen als positiv. Der FAM-Kanal (blau) zeigt kein Signal an. Der HEX-Kanal (grün) liegt ausserhalb des Messbereichs (rote Linien).

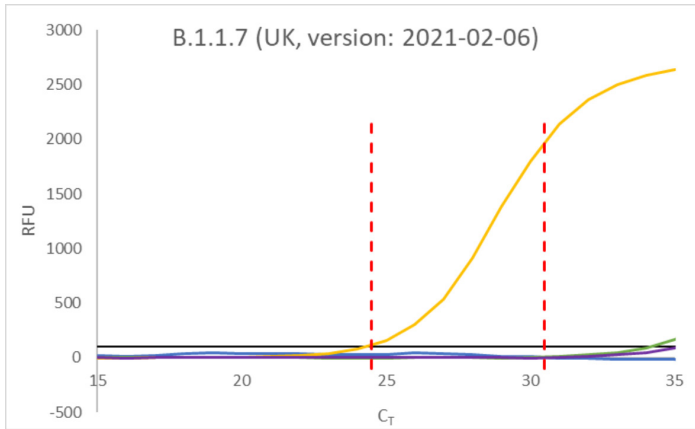


Abb. 3: Nachweis der Mutation B.1.1.7 (UK) SARS-CoV-2 RNA. Nur die Signale eines Kanals (orange: ROX) zählen als positiv. Der FAM-Kanal (blau) zeigt kein Signal an. Der HEX-Kanal (grün) und der Cy5-Kanal (lila) liegen ausserhalb des Messbereichs (rote Linien).

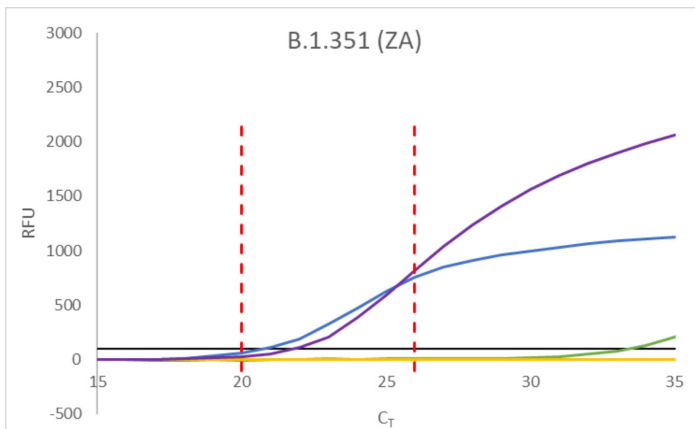


Abb. 4: Nachweis der Mutation B.1.351 (ZA) SARS-CoV-2 RNA. Nur die Signale von zwei Kanälen (blau: FAM, lila: Cy5) zählen als positiv. Der ROX-Kanal (orange) zeigt kein Signal an. Der HEX-Kanal (grün) liegt ausserhalb des Messbereichs (rote Linien).

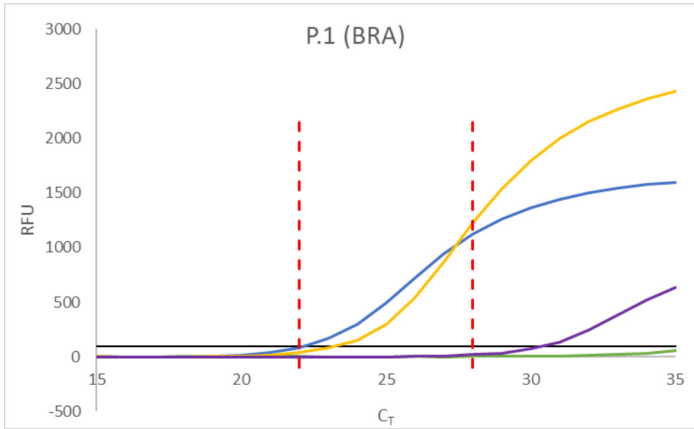


Abb. 5: Nachweis der Mutation P.1 (BRA) SARS-CoV-2 RNA. Nur die Signale von zwei Kanälen (blau: FAM, orange: ROX) zählen als positiv. Der HEX-Kanal (grün) und der Cy5-Kanal (lila) liegen ausserhalb des Messbereichs (rote Linien).

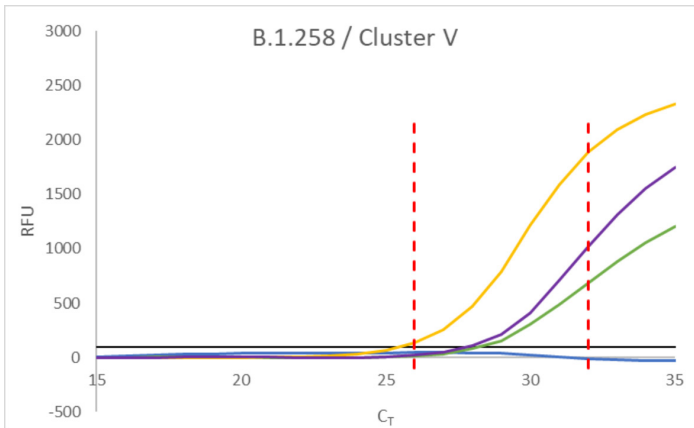


Abb. 6: Nachweis der Mutation B.1.258 SARS-CoV-2 RNA. Die Signale von drei Kanälen (orange: ROX, grün: HEX, lila: Cy5) zählen als positiv. Der FAM-Kanal (blau) zeigt kein Signal an.

## 10.2 Interpretation der Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse können auftreten (Tabelle 7):

Tabelle 7: Interpretation für MutaPLEX® CoV-2 MUT

Signal/ C <sub>T</sub> -Werte				Interpretation
FAM-Kanal (UK)	HEX-Kanal	ROX-Kanal (ZA)	Cy5-Kanal (BRA)	
del69/70	N501Y	del241-243	H655Y	
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>Positives Ergebnis, die Probe enthält Wildtyp SARS-CoV-2-RNA / keine Mutation.</b>
negativ / ausserhalb des Messbereich	negativ / ausserhalb des Messbereich	<b>positiv</b>	<b>positiv oder negativ / ausserhalb des Messbereich</b>	<b>Positives Ergebnis, die Probe enthält SARS-CoV-2-RNA der Mutation B.1.1.7 (UK).</b>
<b>positiv</b>	negativ / ausserhalb des Messbereich	negativ / ausserhalb des Messbereich	<b>positiv</b>	<b>Positives Ergebnis, die Probe enthält SARS-CoV-2 RNA der Mutation B.1.351 (ZA).</b>
<b>positiv</b>	negativ / ausserhalb des Messbereich	<b>positiv</b>	negativ / ausserhalb des Messbereich	<b>Positives Ergebnis, die Probe enthält SARS-CoV-2 RNA der Mutation P.1 (BRA) oder A.27 (Frankreich).<sup>1</sup></b>
negativ / ausserhalb des Messbereich	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv oder negativ / ausserhalb des Messbereich</b>	<b>Positives Ergebnis, die Probe enthält SARS-CoV-2 RNA der Mutation B.1.258.<sup>2</sup></b>
<b>positiv</b>	negativ / ausserhalb des Messbereich	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>Positives Ergebnis, die Probe enthält SARS-CoV-2 RNA mit der Spike-Mutation N501Y.</b>
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	negativ / ausserhalb des Messbereich	<b>Positives Ergebnis, die Probe enthält SARS-CoV-2 RNA mit der Spike-Mutation H655Y.</b>
negativ	negativ	negativ	negativ	<b>Negatives Resultat. Der Test sollte wiederholt werden.</b>

<sup>1</sup> Die Mutation P.1 (nachzuweisende Variante) und A.27 können mit dieser PCR nicht unterschieden werden. Das Probe muss durch eine andere Methode bestätigt werden.

<sup>2</sup> Das Mutationsmuster impliziert auch SARS-CoV-2 Cluster V (Mink, DK), aber diese Variante ist offiziell erodiert.

## 11 VALIDIERUNGSDATEN

### No Template Kontrolle

Die „No Template Kontrolle“ darf keinen  $C_T$  im FAM-, HEX, ROX und Cy5-Kanal anzeigen.

### Positive Kontrolle

Alle Positivkontrollen müssen eine positive, d. h. exponentielle Amplifikationskurve in den Kanälen FAM, Cy5, ROX und HEX aufweisen. Die Positivkontrollen müssen unter einen  $C_T$ -Wert von 30 fallen.

## 12 EINSCHRÄNKUNGEN

- Um optimale Ergebnisse zu gewährleisten sollte der Assay immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchgeführt werden.
- Die MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die Richtlinien der Guten Laborpraxis (*Good Laboratory Practice*) sind bei der Durchführung dieses Assays einzuhalten.
- Alle Reagenzien genau auf Verunreinigungen und Kontamination überprüfen. Alle verdächtigen Reagenzien sollten, gemäß den Richtlinien, entsorgt werden.
- Dieser Test kann nicht direkt mit oder an einer biologischen Proben verwendet werden. Geeignete Extraktionsmethoden für Nukleinsäure müssen vor der Anwendung dieses Test durchgeführt werden.
- Wie bei jedem diagnostischen Test müssen die Ergebnisse des MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR-Kits unter Einbezug aller Ergebnisse aus Klinik und Labor interpretiert werden.

## 13 PROBLEMBEHANDLUNG

Folgende Problembeschreibung soll bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-Time-RT-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen, haben wenden Sie sich bitte direkt an Immundiagnostik AG.

### **Kein Fluoreszenzsignal im FAM- und/oder ROX- und/oder Cy5- und/oder HEX-Kanal der Positivkontrolle**

#### ***Der gewählte Kanal entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen Kanal***

Wählen Sie den entsprechenden Kanal gemäß Tabelle 6 aus.

#### ***Fehlerhaftes Ansetzen des Master-Mix***

Stellen Sie sicher, dass das Enzym zum Master-Mix hinzugefügt wird (Kapitel 9).

#### ***Fehlerhaftes Ansetzen der Real-Time-RT-PCR***

Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den im Kapitel 9 (Durchführung) beschriebenen Schritten.

#### ***Fehlerhaftes Temperaturprofil***

Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (Tabelle 5 und 6).

#### ***Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum***

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kit-Etikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel Transport und Lagerung beschrieben.

### **Schwaches oder kein Signal für schwache, positive Proben mit C<sub>T</sub> 32 in der Screening PCR.**

#### ***Die Empfindlichkeit und Fluoreszenzintensität können auf einzelne Real-Time-PCR Cycler unterschiedlich sein.***

Testen Sie die Probe erneut in einer neuen Verdünnung, indem Sie die Probe mit 4 µl und einem Verdünnungspuffer von 18 µl verwenden.

### **Detektion eines Signals im FAM- und/oder ROX- und/oder Cy5- und/oder HEX-Kanal der „no template“-Kontrolle.**

#### ***Kontamination des Real-Time-RT-PCR-Ansatzes***

Wiederholen Sie die Real-Time-RT-PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Reaktionsgefäße



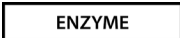



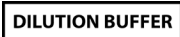







sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben. Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die Real-Time-RT-PCR mit einem neuen Kit.

## 14 LEISTUNGSDATEN

Die Anpassung und Validierung des MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR-Kits ist ein fortlaufender Prozess. Daher werden Vergleichsdaten aus Sequenzen der eluierten SARS-CoV-2 RNA kontinuierlich ausgewertet.

Detaillierte Informationen zum aktuellen Wissensstand erhalten Sie bei der Immunodiagnostik AG. Bitte richten Sie Ihre Anfrage an [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com).

## 5 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

RNA	Ribonukleinsäure		Katalognummer
RT-PCR	Reverse-Transkriptase		Zu verwenden mit
	Enzym		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Positive Kontrolle		Obere Temperaturgrenze
	Verdünnungspuffer		Hersteller
	<i>In-vitro</i> Diagnostikum		Chargennummer
	Verwendbar bis JJJJ-MM-TT		Arbeitsanleitung beachten
	Reaktionsmix		Inhalt

## 16 LITERATUR

1. [www.who.int/health-topics/coronavirus](http://www.who.int/health-topics/coronavirus)
2. Rambaut et al. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. nCoV-2019 Genomic Epidemiology

3. Garry. Mutations arising in SARS-CoV-2 spike on sustained human-to-human transmission and human-to-animal passage. nCoV-2019 Genomic
4. Faria et al. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. nCoV-2019 Genomic Epidemiology



# MutaPLEX® CoV-2 MUT

## Real-Time-RT-PCR Kit

*For the simultaneous differentiation of the novel coronavirus  
(SARS-CoV-2), lineages B.1.1.7 (UK),  
B.1.351 (ZA) and P.1 (BRA)*

Valid from 2021-03-08



**KG193196**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1</b>	<b>INTENDED USE</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>PACKAGE CONTENTS</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY</b>	<b>20</b>
<b>6</b>	<b>WARNINGS AND PRECAUTIONS</b>	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>SAMPLE MATERIAL</b>	<b>21</b>
<b>8</b>	<b>SAMPLE PREPARATION</b>	<b>21</b>
<b>9</b>	<b>REAL-TIME-RT-PCR</b>	<b>21</b>
	9.1 <i>Important points before starting</i>	21
	9.2 <i>Procedure</i>	22
	9.3 <i>Instrument settings</i>	22
	9.4 <i>Thresholds</i>	24
<b>10</b>	<b>DATA ANALYSIS</b>	<b>24</b>
	10.1 <i>Interpretation of the PCR Signals</i>	24
	10.2 <i>Interpretation of the Results</i>	28
<b>11</b>	<b>ASSAY VALIDATION</b>	<b>29</b>
<b>12</b>	<b>LIMITATIONS OF THE METHOD</b>	<b>29</b>
<b>13</b>	<b>TROUBLESHOOTING</b>	<b>29</b>
<b>14</b>	<b>KIT PERFORMANCE</b>	<b>31</b>
<b>15</b>	<b>ABBREVIATIONS AND SYMBOLS</b>	<b>31</b>
<b>16</b>	<b>LITERATURE</b>	<b>31</b>

## 1 INTENDED USE

The MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time RT-PCR Kit is an assay for the simultaneous differentiation of the novel coronavirus (SARS-CoV-2) lineages B.1.1.7 (United Kingdom, UK), B.1.351 (South Africa, ZA) and P.1 (Brasilia, BRA) from biological specimens.

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time RT-PCR Kit contains four specific primer and probe systems for the detection of SARS-CoV-2 spike protein mutations. Each mutation is related to one specific dye. If one of the mutations is present, the specific channel will show no or a delayed signal. The mutations covered with this assay are del69/70 (FAM), del 241-243 (ROX), N501Y (HEX) and H655Y (Cy5). In case of B.1.1.7 (UK), B.1.351 (ZA) or P.1 (BRA), the HEX channel and one additional channel, depending on the mutation, will show no or a delayed signal (Table 7). In this case, the other two channels should show a normal signal.

## 3 PACKAGE CONTENTS

The reagents supplied are sufficient for 96 reactions.

Table 1: Components of the MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR Kit .

Label	Lid Colour	Content
Reaction Mix	yellow	1 x 1 325 µl
Dilution Buffer	white	2 x 960 µl
Enzyme	blue	1 x 19.2 µl
Positive Control	red	1 x 150 µl

## 4 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- Sterile microtubes
- Calibrated precision pipets (adjustable volume) and sterile single-use tips with filter
- Disposable gloves
- Table centrifuge
- Vortex
- Real-Time PCR instrument
- Optical PCR reaction tubes with lid or optical PCR reaction plate with optical foil
- Optional: Liquid handling system for automation

## 5 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time RT-PCR Kit is shipped on dry ice or cool packs. All components must be stored at maximum -20°C in the dark immediately after receipt. Do not use reagents after the date of expiry printed on the package. Up to 20 freeze and thaw cycles are possible. For convenience, opened reagents can be stored at +2 to +8°C for up to 6 months. Protect kit components from direct sunlight during the complete test run.

## 6 WARNINGS AND PRECAUTIONS

Read the Instruction for Use carefully before using the product.

Before first use check the product and its components for:

- Use of this product is limited to personnel specially instructed and trained in the techniques of Real-Time PCR procedures.
- Specimens should always be treated as infectious and/or biohazardous in accordance with safe laboratory procedures.
- Avoid microbial and nuclease (DNase/RNase) contamination of the eluates and the components of the kit.
- Always use DNase/RNase-free disposable pipette tips with aerosol barriers.
- Always wear protective disposable powder-free gloves when handling kit components.
- Use separated and segregated working areas for (1) sample preparation, (2) reaction setup and (3) amplification/detection activities. The workflow in the laboratory should proceed in unidirectional manner. Always wear disposable gloves in each area and change them before entering a different area.
- Dedicate supplies and equipment to the separate working areas and do not move them from one area to another.
- Store positive and/or potentially positive material separated from all other components of the kit.
- Do not open the reaction tubes/plates post amplification, to avoid contamination with amplicons.
- Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state and/or federal regulations or accrediting organisations.

- Do not autoclave reaction tubes after the PCR, since this will not degrade the amplified nucleic acid and will bear the risk to contaminate the laboratory area.
- Discard sample and assay waste according to your local safety regulations.

## 7 SAMPLE MATERIAL

Starting material for MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time RT-PCR Kit is RNA qualified SARS-CoV-2 positive by Real-Time RT-PCR (e.g. MutaPLEX Coronavirus Real-Time RT-PCR Kit, Imundiagnostik, Cat. No. KG 1926).

**Eluates with very low copy numbers resulting in CT values >32 are not suitable for testing with the MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time RT-PCR.**

## 8 SAMPLE PREPARATION

The eluted RNA has to be diluted 1:10 in Dilution Buffer to optimize the condition for the mutation detection. **Do not use other buffers than the Dilution buffer included in the MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time RT-PCR Kit.**

Table 2: Preparation of the Sample

Volume per Reaction
2 µl eluted RNA
18 µl Dilution Buffer

## 9 REAL-TIME-RT-PCR

### 9.1 Important points before starting

- Please pay attention to chapter 7 “Warnings and precautions”.
- Before setting up the Real-Time-RT-PCR familiarise yourself with the Real-Time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the RT-PCR set up.
- In every RT-PCR run one Positive Control and one ,no template control’ (Dilution Buffer) should be included.

- Before each use, all reagents should be thawed completely at room temperature, thoroughly mixed (except the Enzyme) and centrifuged very briefly.
- Due to the high viscosity of the Enzyme (blue lid), prewarming at room temperature for 15 min is recommended.

## 9.2 Procedure

### Prepare the Master Mix according to Table 3.

The master mix contains all of the components needed for RT-PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 3: Preparation of the master mix

Volume per reaction	Volume master mix
13.8 µl Reaction Mix	13.8 µl x (N+1)
0.2 µl Enzyme	0.2 µl x (N+1)

### Real-Time-RT-PCR set up

- Place the number of optical PCR reaction tubes needed into the respective tray of the Real-Time PCR instrument / take an optical PCR reaction plate.
- Pipet 14 µl of the Master Mix into each optical PCR reaction tube / the optical PCR reaction plate.
- Add **6 µl** of the diluted eluates, the Positive Control and the 'no template control' to the corresponding optical PCR reaction tube / the optical PCR reaction plate (Table 4).
- Close the optical PCR reaction tubes / the optical PCR reaction plate immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

Table 4: Preparation of the Real-Time-RT-PCR

Component	Volume
Master mix	14.0 µl
Sample	6.0 µl
Total volume	20.0 µl

## 9.3 Instrument settings

For the Real-Time-RT-PCR use the thermal profile shown in table 5.

Table 5: Real-Time-RT-PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	Number of Cycles	Aquisitions
Reverse Transcription	10 min	45 °C	1	no
Initial Denaturation	5 min	95 °C	1	no
Denaturation	10 sec	95 °C	45	no
Annealing and Extension	40 sec	60 °C		end of step

Dependent on the Real-Time instrument used, further instrument settings have to be adjusted according to table 6.

Table 6: Overview of the instrument settings required for the MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR.

Real-Time-PCR-Instrument	Parameter Reaction Mix	Detection channel	Notes															
LightCycler 480II	del69/70 (UK) N501Y (UK, ZA, BRA) del241-243 (ZA) H655Y (BRA)	465–510 533–580 533–610 618–660	Colour Compensation Kit MutaPlex® CC-1 (KG19-5-CC) is required <table border="1"> <thead> <tr> <th>Melt factor</th> <th>Quant factor</th> <th>Max integration time (s)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Melt factor	Quant factor	Max integration time (s)	1	10	1	1	10	2	1	10	2	1	10	3
Melt factor	Quant factor	Max integration time (s)																
1	10	1																
1	10	2																
1	10	2																
1	10	3																
QuantStudio 5 Bio-Rad CFX96	del69/70 (UK) N501Y (UK, ZA, BRA) del241-243 (ZA) H655Y (BRA)	FAM HEX ROX Cy5	Reference Dye: None															
NEOS-48 qPCR NEOS-96 qPCR	del69/70 (UK) N501Y (UK, ZA, BRA) del241-243 (ZA) H655Y (BRA)	FAM HEX ROX Cy5	Reference Dye: None															

Real-Time-PCR-Instrument	Parameter Reaction Mix	Detection channel	Notes
Mic qPCR Cyclser	del69/70 (UK)	Green	Gain 8
	N501Y (UK, ZA, BRA)	Yellow	Gain 10
	del241-243 (ZA)	Orange	Gain 10
	H655Y (BRA)	Red	Gain 10

## 9.4 Thresholds

To ensure the quality of the PCR, it is advised to set the thresholds (except LC480II) based on the positive control provided with the kit. The Ct values for the FAM, ROX and Cy5 channel should be at 19 – 22. The Ct for HEX should be 22 – 25, app. 3 - 4 Ct after the FAM signal.

## 10 DATA ANALYSIS

### 10.1 Interpretation of the PCR Signals

**Positive Signal:** There are up to 4 curves present for each sample. For Wildtype samples (Wuhan like SARS-CoV-2) the  $C_T$  values for all dyes of those curves should cluster within a range of 6  $C_T$ . All signals in the range of +6  $C_T$  after the earliest signal, should be accounted as positive signal (examples in Fig.1 - 6).

**Negative Signal:** In case of a mutation, different fluorescence channels will show no amplification. For higher concentrated samples, a decreased signal might appear in the FAM, HEX, ROX or Cy5 channel. In this case, the  $C_T$  values have to be aligned in relation to the earliest  $C_T$ . If the decreased signal shows a difference of 6  $C_T$  or more, the Signal should be accounted as negative signal.

**Cutoff:** There is no explicit cutoff for the PCR, but if there are results with a single curve for only one dye, showing a  $C_T$  of > 40, it is recommended to repeat the PCR with a new dilution, as suggested in the 'trouble shooting' section for very weak samples.

**Figure 1, Figure 2, Figure 3, Figure 4, Figure 5 and Figure 6** show examples for Real-Time RT-PCR results of the wildtype and different lineages of SARS-CoV-2.



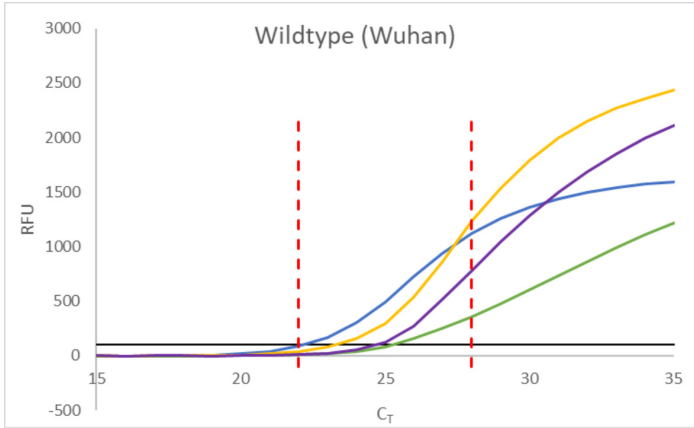


Fig 1: Detection of Wuhan like SARS-CoV-2 RNA. All four channels (blue: FAM, green: HEX, orange: ROX, purple: Cy5) show a positive signal and the C<sub>T</sub> values are close to each other (less than 6 C<sub>T</sub> between the first and the last signal, red lines).

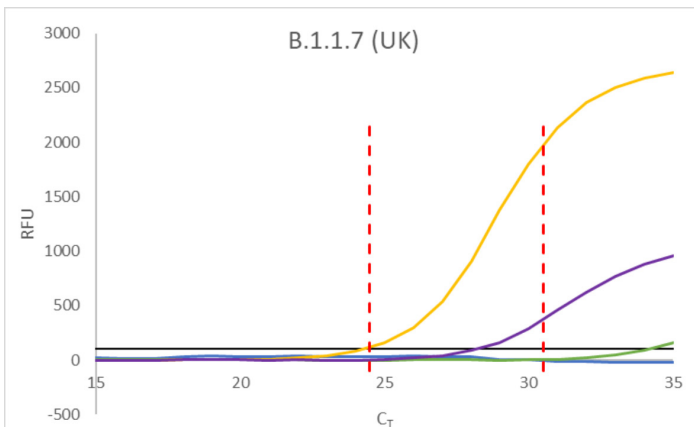


Fig 2: Detection of Lineage B.1.1.7 (UK) SARS-CoV-2 RNA. Only the signals of two channels (orange: ROX, purple: Cy5) count as positive. The FAM channel (blue) shows no signal. The HEX channel (green) is out of range (red lines).

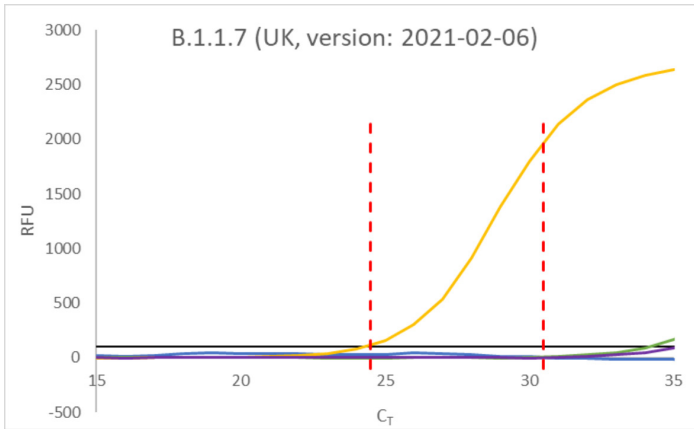


Fig 3: Detection of Lineage B.1.1.7 (UK) SARS-CoV-2 RNA. Only the signals of one channel (orange: ROX) count as positive. The FAM channel (blue) shows no signal. The HEX channel (green) and the Cy5 channel (purple) are out of range (red lines).

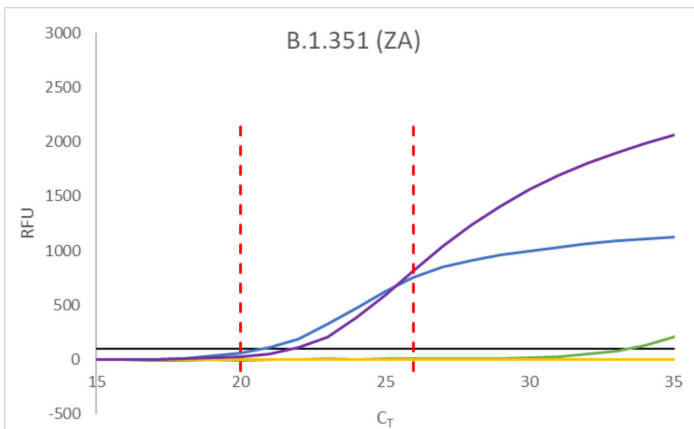


Fig 4: Detection of Lineage B.1.351 (ZA) SARS-CoV-2 RNA. Only the signals of two channels (blue: FAM, purple: Cy5) count as positive. The ROX channel (orange) shows no signal. The HEX channel (green) is out of range (red lines).

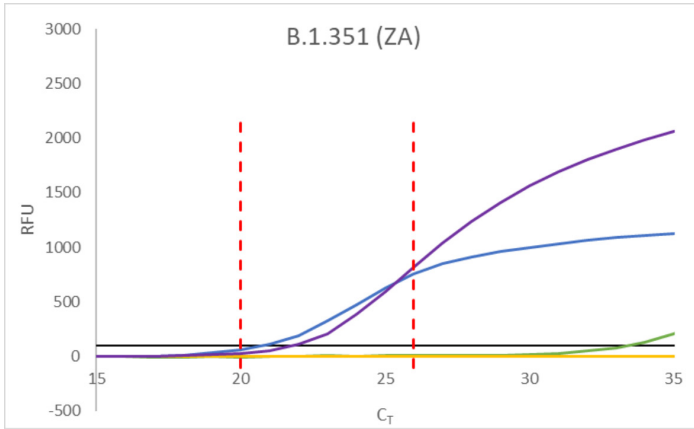


Fig 5: Detection of Lineage P.1 (BRA) SARS-CoV-2 RNA Only the signals of two channels (blue: FAM, orange: ROX) count as positive. The HEX channel (green) and the Cy5 channel (purple) are out of range (red lines).

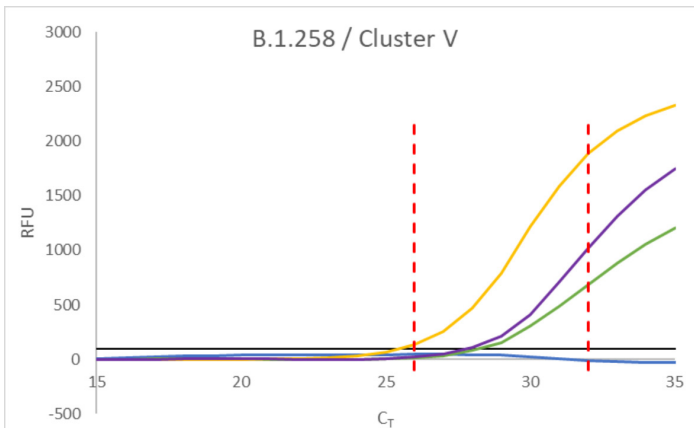


Fig 6: Detection of Lineage B.1.258 SARS-CoV-2 RNA. The signals of three channels (orange: ROX, green: HEX, purple: Cy5) count as positive. The FAM channel (blue) shows no signal.

## 10.2 Interpretation of the Results

Table 7: Interpretation of the results for MutaPLEX® CoV-2 MUT

Signal/ C <sub>T</sub> -Value				Interpretation
FAM (UK)	HEX	ROX (ZA)	Cy5 (BRA)	
del69/70	N501Y	del241-243	H655Y	
<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>Positive result, the sample contains SARS-CoV-2 Wildtype RNA. No Variant of Concern.</b>
negative / out of range	negative / out of range	<b>positive</b>	<b>positive or negative / out of range</b>	<b>Positive result, the sample contains SARS-CoV-2-RNA Lineage B.1.1.7 (UK).</b>
<b>positive</b>	negative / out of range	negative / out of range	<b>positive</b>	<b>Positive result, the sample contains SARS-CoV-2-RNA Lineage B.1.351 (ZA).</b>
<b>positive</b>	negative / out of range	<b>positive</b>	negative / out of range	<b>Positive result, the sample contains SARS-CoV-2-RNA Lineage P.1 (BRA) or A.27 (France)<sup>1</sup>.</b>
negative / out of range	<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive or negative / out of range</b>	<b>Positive result, the sample contains SARS-CoV-2-RNA Lineage B.1.258. No Variant of Concern.<sup>2</sup></b>
<b>positive</b>	negative / out of range	<b>positive</b>	<b>positiv</b>	<b>Positive result, the sample contains SARS-CoV-2 RNA carrying the Spike: N501Y mutation. No Variant of Concern.</b>
<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive</b>	negative / out of range	<b>Positive result, the sample contains SARS-CoV-2 RNA carrying the Spike: H655Y mutation. No Variant of Concern.</b>
negative	negative	negative	negative	<b>Negative result. The sample must be repeated.</b>

<sup>1</sup> P.1 (Variant of Concern) and A.27 can not be distinguished by the PCR. The sample needs confirmation by another method.

<sup>2</sup> The mutation pattern implies SARS-CoV-2 Cluster V (mink, DK) as well, but this variant is officially eradicated.

## 11 ASSAY VALIDATION

### No template Control

The 'no template control' must show no  $C_T$  in the FAM, HEX, ROX and Cy5 channel.

### Positive controls

All parameters in the Positive Control must show a positive (i.e. exponential) amplification curve in the different channels FAM, Cy5, ROX and HEX. The Positive Control must fall below a  $C_T$  of 30.

## 12 LIMITATIONS OF THE METHOD

- Strict compliance with the instructions for use is required for optimal results.
- Use of this product is limited to personnel specially instructed and trained in the techniques of Real-Time PCR and *in vitro* diagnostic procedures.
- Good laboratory practice is essential for proper performance of this assay.
- All reagents should be closely monitored for impurity and contamination. Any suspicious reagents should be discarded.
- This assay must not be used on a biological specimen directly. Appropriate nucleic acid extraction methods have to be conducted prior to using this assay.
- The presence of RT-PCR inhibitors may cause false negative or invalid results.
- As with any diagnostic test, results of the MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time-RT-PCR Kit need to be interpreted in consideration of all clinical and laboratory findings.

## 13 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a Real-Time RT-PCR. If you have further questions, please do not hesitate to contact our scientists on [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com).

**No fluorescence signal in the FAM and/or ROX and/or Cy5 and/or HEX of the positive control*****The selected channel for analysis does not comply with the protocol***

Select the detection channels according to table 6.

***Incorrect preparation of the Master Mix***

Make sure the enzyme is added to the master mix (chapter 9).

***Incorrect configuration of the Real-Time-RT-PCR***

Check your work steps and compare with chapter 9.

***The programming of the thermal profile is incorrect***

Compare the thermal profile with the protocol 'Instrument Settings' in Table 5 and Table 6.

***Incorrect storage conditions for one or more kit components or kit expired***

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter Transport, storage and stability.

**Detection of a fluorescence signal in the FAM and/or ROX and/or Cy5 and/or HEX channel of the ,no template control'.*****Contamination during preparation of the Real-Time RT-PCR***

Repeat the Real-Time RT-PCR in replicates. If the result is negative in the repetition, the contamination occurred when the samples were pipetted into the optical PCR reaction tubes. Make sure to pipet the Positive Control last and close the optical PCR reaction tube immediately after adding the sample. If the same result occurs, one or more of the kit components might be contaminated. Make sure that workspace and instruments are decontaminated regularly. Use a new kit and repeat the Real-Time RT-PCR.

**No or very weak signals for weak, prequalified samples with Ct 32 in the screening PCR.*****Sensitivity and Fluorescence intensity may differ on individual Real-Time PCR Cycler.***



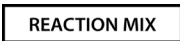

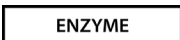









Retest the sample in a new dilution, using 4 µl sample and 18 µl dilution buffer.

## 14 KIT PERFORMANCE

The adjustment and validation of the MutaPLEX® CoV-2 MUT Real-Time RT-PCR kit is an ongoing process. Hence, comparison data from sequences of eluted SARS-CoV-2 RNA are evaluated continuously.

Detailed information based on the latest state of knowledge is available at Immundiagnostik AG. Please address your inquiry to [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com).

## 15 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

RT-PCR	Reverse transcription-PCR		Catalog number
RNA	Ribonucleid acid		<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Reaction mix		Contains sufficient for <n> test
	Enzyme		Upper limit of temperature
	Positive control		Manufacturer
	Dilution Buffer		Use by YYYY-MM-DD
	Lot number		Consult instructions for use
	use with		Content

## 16 LITERATURE

1. [www.who.int/health-topics/coronavirus](http://www.who.int/health-topics/coronavirus)
2. Rambaut et al. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. nCoV-2019 Genomic Epidemiology
3. Garry. Mutations arising in SARS-CoV-2 spike on sustained human-to-human transmission and human-to-animal passage. nCoV-2019 Genomic
4. Faria et al. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. nCoV-2019 Genomic Epidemiology

## **Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

[info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

